

ENU 诱导点突变——大规模基因突变和功能研究

孙岩松¹ 杨晓^{2*}

(¹ 军事医学科学院实验动物中心, ² 军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学实验室, 北京 100071)

摘 要 ENU 诱导点突变正在成为一种大规模基因功能研究的有效手段。这里介绍了 ENU 诱变的机制、影响诱变效率的因素、ENU 诱变的策略、表型的筛选、点突变的鉴定以及相关的研究和取得的一些最新进展。

关键词 ENU, 基因, 诱变

中图分类号 Q753 **文献标识码** C **文章编号** 1000-3061(2001)04-0365-06

随着宏伟的人类基因组计划渐近尾声,越来越多的低等生物如细菌、酵母、线虫的序列测定也已经完成,作为脊椎动物首选的模式生物体系——小鼠的基因组序列已经被提上议事日程并将于 5 年内完成。人类开始进入一个以大规模地、系统地研究基因功能和在人类生理和病理过程中的作用为起始标记的后基因组时代。利用模式生物体系鉴定随机突变和进行诱发突变研究,研究转基因动物和基因定位失活或者基因定位突变动物的表型极大地促进了人类对基因功能的了解。小鼠因其与人类相似的基因组序列、发育和生化途径、生理特点而成为研究人类疾病的病理过程和遗传基础理想的模式生物体系。

进行基因功能分析的策略可分为基因驱动法(Gene-driven approaches)和表型驱动法(Phenotype-driven approaches)。单基因剔除是典型的基因驱动的研究。研究者必须针对靶位点在染色体组文库中筛选相关的染色体组克隆、绘制相应的物理图谱、构建特异性的打靶载体以及筛选中靶 ES 细胞等。通常一个基因剔除纯合子小鼠的获得需要 1 年或更长的时间。面对人类基因组计划产生出来的巨大的功能未知的遗传信息,传统的基因剔除方法显得有些力不从心。另一种基因驱动的研究是随机大规模基因剔除——基因捕获。利用基因捕获可以建立一个携带随机插入突变的 ES 细胞库,在单次实验中可以获得数以百计的带有单基因剔除的 ES 克隆。它的缺陷是许多经过基因捕获获得的带有基因无义突变的动物或者在胚胎期死亡或是没有明显的表型,很难直接得到与人类临床疾病症状相近的模型小鼠。事实上,许多人类疾病并不是由于基因功能完全丧失而引起的,因此,除了完全基因剔除小鼠,带有各种突变,如基因功能获得或是部分基因缺失的动物模型将有助于对基因功能更全面和深入的了解。

用放射线导致缺失和突变以及用各种化学诱变剂诱导

点突变等许多经典的遗传学研究属于表型驱动的研究。此类研究的出发点不是任何特定的基因,而是从大量的随机突变中通过表型筛选研究感兴趣的表型及其分子机制。这种表型驱动研究的优点是显而易见的。采用随机诱变的方法可以在短时间内产生数目巨大的突变动物,可能通过表型筛选获得与人类疾病临床症状相似的模型动物。鉴定随机诱变动物的遗传基础曾经是很艰苦的工作,最近随着基因组研究的迅速进展和基因打靶技术的发展,研究者发展了一些策略将基因驱动的研究与表型驱动的研究结合起来,使得一些传统的诱变剂如乙烷亚硝基脲在后基因组时代大规模的基因功能研究中大放异彩^[1,2]。

1 ENU 诱变的机制

ENU 是一种人工合成的能导致多种生物随机、单碱基突变的化合物。ENU 能不依赖于任何代谢过程而通过烷化反应将其乙烷基转移到 DNA 碱基的氧原子或氮原子上,导致碱基错配或碱基置换^[3,4]。碱基上容易作用的位点包括腺嘌呤上的 N1、N3 和 N7;鸟嘌呤上的 O6、N3 和 N7;胸腺嘧啶上的 O2、O4 和 N3 以及胞嘧啶上的 O2 和 N3。这种由 ENU 转移来的乙烷基并不直接形成突变,但这种加合了乙烷基的碱基在复制中会被细胞复制系统错误的鉴定进而导致错配。经过两轮的复制,不能被细胞修复系统有效识别的单碱基突变就形成了(图 1)。

2 ENU 诱导的突变类型和诱变效率

ENU 在各种组织器官中均有致突变作用,其效率因 ENU 剂量、细胞类型和检测系统而不同。这也许是因为具有不同组织特异性代谢途径的细胞拥有不同的内环境,而且不同的细胞也拥有效率不同的 DNA 修复系统^[5]。ENU 诱变效率在雄性小鼠减数分裂前的精原干细胞中达到最高。单位点的

收稿日期 2000-12-08, 修回日期 2001-02-13。

基金项目 北京市科技项目(954981000, 954020600), 国家自然科学基金(30070837), 国家高技术研究发展计划(102-08-08-02), 国家杰出青年科学基金(30025028)和军事医学科学院创新启动基金资助。

* 通讯作者。Tel 86-10-63895937, Fax 86-10-63833521, E-mail: yangx@mic.bmi.ac.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

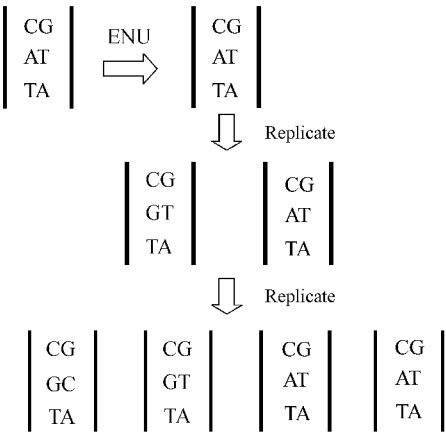


图1 ENU 诱导碱基置换的分子机制

Fig.1 Molecular mechanism of ENU-induced base pair substitution
Thymine becomes the O⁴-ethyl adduct through ENU mediated alkylation.
A/T were substituted by G/C after twice replication.

突变频率可达 $(6 \sim 1.5) \times 10^{-3}$,相当于对于任何特定的位点筛选 175 ~ 655 个配子便有可能得到一个携带点突变的配子^[6,7]。用 ENU 处理的雌性小鼠产生突变的概率比雄性小鼠低得多^[8]。

对 ENU 诱变产生的 62 个经生殖系遗传的突变进行的分析表明 ,ENU 在 小 鼠 中 主 要 引 起 A/T 到 T/A 的 颠 换 (44%) ,A/T 到 G/C 的 转 换 (38%) ,G/C 到 C/G 颠 换 (3%) ,A/T 到 C/G 的 转 换 (5%) 和 G/C 到 C/G 的 转 换 (2%)^[9]。这些突变在蛋白质水平上导致 64% 的错义突变、10% 的无义突变和 26% 的拼接错误。由于这种诱导点突变的特性 ,ENU 可用于诱变产生各种类型的突变基因 ,如完全失去功能的无义突变 ,部分功能丧失的亚等位基因、功能获得的显性突变等等。采用 ENU 对颤栗基因(quaking ,*qk*)的研究证实用这种方法研制多种等位基因突变确实给研究者提供了更多的关于特定基因功能的信息。用 ENU 诱导的 5 种点突变(qk^{1-1} , qk^{k2} , qk^{k2} , qk^{k3} , qk^{c5})中 ,有 4 种 *qk* 突变基因(qk^{1-1} , qk^{k2} , qk^{k2} , qk^{k3})纯合会导致小鼠在胚胎期 E8.5 ~ 10.5 天死于中枢神经缺陷 ,只有一种突变(qk^{c5})的纯合子小鼠会在出生后产生一种与天然突变小鼠(qk^v/qk^v)类似的颤栗的表型^[10]。

3 ENU 剂量对不同小鼠品系的影响

不同的小鼠对 ENU 耐受的能力不同^[11]。高剂量的 ENU 对小鼠是有毒的 ,可以直接导致小鼠死亡。此外 ,ENU 也是一种潜在的致癌剂 ,一些品系的小鼠在 ENU 处理后会很快死于肿瘤。ENU 通常会缩短小鼠的寿命。由于 ENU 是一种作用于干细胞的诱变剂 ,小鼠的造血干细胞通常也会受影响 ,因此 ,ENU 处理过的小鼠常常由于免疫抑制而容易被病原微生物感染。

许多研究显示 ENU 在 75 ~ 150 mg/kg 剂量范围内导致的突变率呈线性增长^[12]。已知最高的突变率是给远交系(101 × C3H)F1 代小鼠连续 4 周每周注射 100 mg/kg ENU 后获得的^[6]。但是 ,许多近交系小鼠和一些远交系小鼠品系用同样

的剂量处理后会绝育或者死亡。远交系的小鼠对于 ENU 耐受的能力比近交系强 ,大多数 F1 代远交系小鼠可以耐受 250 mg/kg 的剂量 ,而 C57BL/6J 用同样的剂量处理后却活不长。大多数品系的小鼠可以耐受 200 mg/kg 的 ENU ,其中有些品系如 BTBR^{tf/tf} 在此剂量下也获得了高突变率^[7]。FVB/N 品系的小鼠只能耐受更低剂量的 ENU ,其它品系常用的剂量会导致该品系小鼠死亡或绝育。有实验证实 ,150 mg/kg 或者 50 mg/kg 剂量的 ENU 处理 FVB/N 雄性小鼠 ,突变率可达到 $(1 \sim 1.1) \times 10^{-4}$ ^[13]。

ENU 处理过的雄性小鼠要经过一段不育期才能重新获得生育能力。不育期的长短也可以作为衡量突变剂处理效果的指标。这是因为 ENU 处理会引起精原细胞大量死亡 ,不育期的长短反应了所剩下的精原干细胞的数目。精原干细胞越少 ,重建睾丸细胞所需要的时间越长。不育期太长或者太短都不利于突变的筛选。

4 ENU 诱导突变的策略

4.1 大规模 ENU 诱变实验

大规模的 ENU 诱变研究在美国、英国、德国、澳大利亚和日本的多个小鼠基因组中心已经开展(表 1)^[9]。这些研究或是筛选基因的显性突变 ,或是筛选基因的隐性突变 ;有些只研究特定染色体组区域的基因突变 ,有些则研究全基因组的突变。所谓大规模的筛选是指这些研究不仅仅局限于某个特定基因或者特定的信号通路和代谢途径 ,而是以大规模地研制突变小鼠作为遗传资源库 ,规模化地研究基因功能为目的。

数以百计 10 周龄的雄性小鼠用 ENU 处理以保证每周有数以百计的子代鼠用于表型分析。通过对 F1 代小鼠进行形态学、行为学、血液学、生理生化等指标的检测 ,筛选基因的显性突变。对于基因隐性突变的筛选 ,通常会将 F1 代的雄性鼠与野生型雌性小鼠交配 ,再将 F2 代雌性小鼠与 F1 代雄性鼠回交 ,获得的 F3 代小鼠用于大规模筛选。之所以不用 F1 代与 F0 代雄性小鼠回交 ,主要是因为注射过 ENU 的雄性小鼠的生育能力十分有限。

4.2 小规模 ENU 诱变实验

与大规模的 ENU 诱变实验相比 ,小规模 ENU 诱变筛选通常只局限于特定的靶基因或者特定的代谢途径。如将 F0 代 ENU 诱变小鼠或者 F1 代雄性小鼠与携带某种纯合致死突变(*m*)的杂合子雌鼠交配 ,获得的子代小鼠基因型或者是(+/*m*) ,或者是(*/*m*) , * 代表 ENU 诱导的点突变 ,无论是显性突变或是隐性突变 ,由于等位基因 *m* 功能完全丧失 , * 突变导致基因功能代偿不足所引起的表型在第一代子代小鼠就能显示出来。此外 ,用敏感性高的方法在子一代小鼠筛选影响单一信号通路或者代谢途径的显性突变也不失为一种小规模筛选的策略。

4.3 基因驱动和表型驱动研究方法相结合的 ENU 诱变策略

在果蝇中进行的经典遗传学研究依赖于大量的遗传学工具 ,许多基因缺失 ,基因重复和基因倒置突变体使遗传筛

表 1 世界范围的大规模 ENU 诱变研究
Table 1 Worldwide large-scale ENU mutagenesis studies

实验室	遗传筛选	小鼠染色体组区域	表型筛选	参考文献	网 址
英国医学研究委员会小鼠基因组中心 ,Harwell	显性突变 隐性突变	全基因组 M13	神经生物学	Rogers , 1997 ^[14]	http://www.mgu.har.mrc.ac.uk/mutabase/
德国 GSF-国家环境和健康研究中心 ,Neuherberg	显性突变 隐性突变	全基因组 全基因组	临床血液学 ,化学、形态 异常、过敏、溶酶体	de Angelis , 1998 ^[11]	http://www.gsf.de/isg/groups/enu-mouse.html
美国 Baylor 医学院小鼠基因组中心 ,Houston	隐性突变	M11 M4	基因功能、发育、人类疾病模型	Justice , 1999 ^[9]	http://www.mouse-genome.bcm.tmc.edu
美国宾州大学 Jackson 实验室 ,Philadelphia	隐性突变	M5	基因功能、行为学	Schimenti , 1998 ^[15]	http://lena.jax.org/~jcs/
美国 Oak Ridge 国家实验室 ,Oak Ridge	隐性突变	M7	基因功能、发育学	Rinchick , 1999 ^[16]	http://www.bio.ornl.gov/ht-mouse
澳大利亚医学基因组中心 ,Canberra	隐性突变	全基因组	可见表型、免疫表型、老年表型		http://jcsmr.anu.edu.au/group_pages/mgc/
日本 REKEN 基因组科学中心 ,Yokohama	显性突变 隐性突变	全基因组	老年表型		

选变得更容易和更有效率。早在 90 年代初 ,研究者就提出带有第 7 号染色体缺失的小鼠可用来筛选 ENU 诱导的缺失区域内的点突变^[16]。基因打靶的研究进展使得研制携带染色体组任意片段的缺失、倒位或者易位突变小鼠成为可能。Ramirez-Solis 应用位点特异的重组酶系统首次在小鼠 ES 细胞中实现了最长 3 ~ 4cM 染色体组片段的缺失、倒位和重复^[17]。Deursen 等将 LoxP 序列通过同源重组引入不同的染色体上 ,利用 Cre 重组酶在小鼠 ES 细胞实现了非同源染色体间的重组^[18]。Justice 等用 Cre-LoxP 系统研制了携带毛色基因标记的染色体组大片段缺失的突变小鼠。此后 ,Zheng 等报道应用 Cre-LoxP 系统研制了带 24 cM 倒位的小鼠。该小鼠在 11 号染色体上 P53 和 Wnt3 基因之间的倒位隐性致死 ,并带有一个显性标记 K14 Agouti 毛色转基因。这种倒位具有平衡染色体(Balancer chromosome)的功能^[19]。将这种毛色基因标记的倒位或缺失突变小鼠用于 ENU 诱变研究 ,通过表型筛选可以分析单倍体区域的隐性突变 ,用此策略可能获得小鼠染色体组任意靶位点功能性的信息。

将基因打靶这种基因驱动的研究和 ENU 诱变这种表型驱动的研究结合起来具有明显的优势。ENU 诱变可以在短时间内产生大量的突变体小鼠 ,但点突变的鉴定依然是耗费时力的工作。采用通过基因打靶获得的特定染色体组缺失或者易位的突变体小鼠可以简化筛选的程序和工作量 ,并把点突变限定在序列已知的区域内 ,这样可以大大简化点突变鉴定的过程。图 2 和图 3 中显示的是美国 Baylor 医学院小鼠基因组中心采用的 ENU 筛选策略。在第一种策略(图 2)中 ,ENU 处理的小鼠在重新获得生育能力后与 Re/Re 雌性小鼠杂交。Re 突变导致小鼠被毛卷曲 ,对野生型直毛是显性的。Re 在此被用作非突变小鼠基因组的标记。子一代小鼠

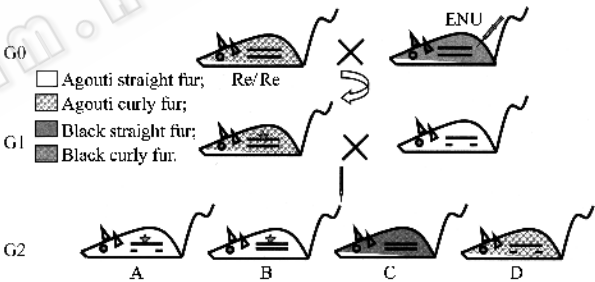


图 2 利用染色体缺失突变体小鼠进行 ENU 诱变的策略
Fig.2 The strategy of ENU mutagenesis using mutant mice with deleted chromosome
The star marks the point mutation introduced by ENU
(Modified from Justice ,1999^[9])

是 ENU 诱导突变的杂合子。将 G1 的雄性小鼠与带有 Agouti 毛色基因标记的染色体缺失突变体小鼠杂交 ,获得的子二代小鼠包括 4 种基因型 ,一种是直毛黄色小鼠 ,它在缺失区域带有点突变(A 型)。子代小鼠中如果没有这种基因型 ,说明 ENU 诱导的突变导致小鼠胚胎期死亡 ,突变基因可以从另外一种直毛黄色的突变基因杂合子小鼠(B 型)中分离。另外两种有卷曲被毛的小鼠(C 和 D 型)均不带突变基因 ,可以不经基因型鉴定而直接放弃。第二种策略(图 3)中 ,ENU 处理后的雄性小鼠与带有平衡致死染色体的小鼠交配 ,带平衡致死染色体的 G1 小鼠再与带平衡染色体和 Re 染色体的小鼠杂交。由于平衡染色体纯合将致小鼠死亡 ,子二代小鼠包括 3 种基因型。其中有用的一种是平衡染色体带 ENU 诱导突变的黄色直毛小鼠。将这些 G2 小鼠进行兄妹交配 ,子三代小鼠中将只有 2 种基因型 ,一种是突变基因纯合子 ,另一种是突变基因杂合子。

© 2014 年 10 月 10 日出版 中国期刊网联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

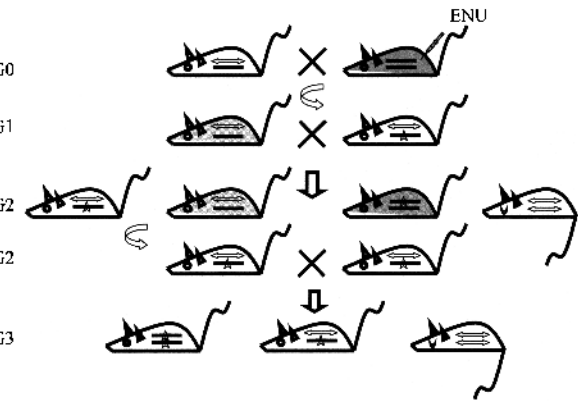


图 3 利用染色体平衡致死突变体进行 ENU 诱变的策略

Fig.3 The strategy of the ENU mutagenesis using chromosome balanced lethal mutant

↔ is chromosomal inversions. Others are the same with the one in Fig.2.(Modified from Justice ,1999^[9])

4.4 用小鼠胚胎干细胞进行的 ENU 诱变实验

大规模进行小鼠 ENU 诱变 ,筛选和维持小鼠突变体的费用是十分高昂的。为了有效地降低费用及对突变效率进行有效的控制 ,研究者尝试在 ES 细胞中进行 ENU 诱变并获得了成功^[20]。他们将 ENU 处理过的 1650 个 ES 克隆进行序列测定检测次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(Hprt)基因上的突变 ,发现突变频率大致在 0.5%。接着的实验证明 ENU 在 Hprt 位点和 HSV- tk 转基因导致丧失功能突变的概率为 0.1% 和 0.12% ,与报道的 ENU 诱导雄性小鼠精原细胞中的突变率相当。在 ES 培养系统中加入 DNA 修复酶(O6-alkylguanine-alkyltransferase ,AGT)的抑制剂(O6-benzyl-guanine ,O6-BG)能将突变的频率提高 2 ~ 4 倍。序列测定的结果显示大多数 ENU 诱导的突变均为单碱基置换引起的无义或者错义突变。尤其重要的是 ,ENU 诱变后的 ES 细胞仍具有整合入生殖系的能力 ,使得研究者可以进一步研究 ENU 诱变导致的表型。

5 ENU 诱导突变表型的筛选

5.1 形态异常表型的筛选

对形态异常小鼠的筛选通常在小鼠出生后和分窝时进行。表 2 是英国小鼠基因组中心大规模形态学筛选所观察的一些指标^[21]。

5.2 行为和神经功能异常筛选

SHIRPA 是 Rogers 等设计的一个检测小鼠行为及神经功能指标的程序^[14]。整个过程可在简单的测试场地完成 ,包括大约 40 个简单的测试 ,每只小鼠约需 10 min。该程序用来发现通过外观无法发现的表型 ,包括肌肉缺陷和运动神经元低下、感官缺陷、精神、小脑平衡、自律行为方面的缺陷等。有表型的小鼠将通过更复杂的测试 ,如探险运动、食物摄取、学习和记忆、焦虑、神经心理学测试等等。

5.3 血液学和临床生化指标筛选

血液学测试在小鼠 6 ~ 10 周时进行。从小鼠尾部取血大约 300μL 在奥林巴斯 AU400 型分析仪上进行自动分析。

表 2 ENU 诱变后大规模形态学筛选的指标

Table 2 Screening for morphological defects following large-scale ENU mutagenesis

分类	出生时观察指标	分窝前观察指标	分窝时观察指标
体型	大/小	大/小	大/小
感觉器官	眼睛的大小和颜色		眼睛的大小和颜色
	耳朵的大小和位置		耳朵的大小和位置
	皮肤和被毛		皮肤的颜色和肌理
皮肤和被毛	贫血	条纹	皮肤的松弛程度
	皮肤的颜色和肌理	皮肤颜色	皮肤松弛程度
	皮肤斑点	皮肤光滑程度	皮肤光滑程度
	卷曲的胡须		卷曲的被毛和胡须
			皮肤的厚度
行为	活动能力	活动能力	活动能力
		震颤和痉挛	震颤和痉挛
		转圈	转圈
		头部晃动	头部晃动
		运动共济失调/步态	运动共济失调/步态
骨骼	小颌		小颌
	无颌		无颌
	短头		短头/宽头
	脊柱侧凸		脊柱侧凸
			裂恶
尾部和手足	短的/卷曲的尾部		短的/卷曲的尾部
	多指或并指		多指或并指
	四肢		四肢
	短的/弯曲的四肢		短的/弯曲的四肢
颜色和白斑点		腹部斑点	腹部斑点
其它	出血	浮肿	浮肿
	浮肿		
	水肿		
	脊椎双线		
	乳糜腹水		

检测指标包括反应造血系统功能的白细胞计数、红细胞计数、血色素、血小板、分类计数 ;反应肝脏功能的 ALT、AST、全蛋白、白蛋白 ;反应肾脏功能指标的 Na、K、Cl 离子含量、肌酐、尿素等 ;反应脂肪代谢的总胆固醇、HDL 胆固醇、甘油三酸酯 ;骨骼发育相关的指标 ALP、钙和无机磷含量和糖代谢相关的指标葡萄糖和重碳酸盐含量等。

5.4 老年症状筛选

随机挑选无表型的小鼠饲养 1 年以上在进行表型测试 ,主要观察是否具有老年相关疾病的表型 ,包括体重增加、动脉硬化、骨质疏松、心血管异常、感知功能和行为异常等等。

6 ENU 诱导点突变的鉴定

像 ENU 诱变实验这样大规模表型驱动的研究,其最终目的是为了鉴定导致表型发生的突变基因。通过快速扩大的小鼠突变体遗传资源,发现新的基因和新的代谢途径,促进人类对哺乳类动物基因功能的了解。现行最有效的鉴定突变基因的方法应首推位置候选基因法(Positional candidate gene approaches)。首先要获得足够的回交小鼠进行连锁分析。通常对 50 只小鼠的分析可将突变大致地定位在 10 ~ 20 cM 的范围内^[21]。而分析 500 只回交小鼠可将突变定位在 1 cM 的范围内。用染色体组大片段缺失突变体小鼠和具有平稳染色体的小鼠进行的 ENU 诱变研究获得的突变已被定位在特定的染色体组区域内,因而不用再进行连锁分析。在突变基因被粗略地定位后,结合突变小鼠的表型进行候选基因的预测。候选基因的线索可从多方面的分析获得。比如小鼠表型是否与某种已知突变基因的人类疾病相似,小鼠的表型与候选范围内某些基因的表达模式具有相关性,候选范围内某些基因的功能与小鼠表型可能相关等等。例如,研究者在 ENU 诱变实验中通过 SHIRPA 筛选到 2 种新的外周髓磷脂蛋白 22(Pmp22)基因突变体便是通过这种候选基因法获得的。研究者通过体外受精进行快速回交实验获得大量的回交动物,采用高通量基因型鉴定的方法将不同小鼠的 DNA 汇集在一起进行基因组筛选。2 种突变均被定位在第 11 号染色体的特定区域,对该区域进行检索发现外周髓磷脂蛋白 22 定位在该区,而且该基因的突变(H12R)导致人类外周神经疾病 Dejerine Sottas 综合症。对两种突变小鼠进行序列分析发现一种小鼠具有与人类疾病相同的突变,另一种突变导致外周髓磷脂蛋白 22 末端 7 个氨基酸的缺失突变^[21]。

随着大规模的诱变实验在全球的进行,基因型鉴定已成为限制小鼠功能基因组学研究发展的瓶颈。一些正在发展中的新方法,包括同质杂交法(Homogeneous hybridization approaches)^[23],寡核苷酸连接法(Oligonucleotide ligation assays , OLA)^[24],MALDI-TOF^[25],变性高压液相分析^[26],基因组芯片^[27],Pyrosequencing^[28],侵入者分析(The invader assay)^[29],将通过检测单个碱基的多态性(Single nucleotide polymorphism SNP)标志进行高通量基因型鉴定。虽然这些方法现在无一被用于常规的全基因组筛选,相信随着技术的进步、更广泛 SNP 标志的发展,稳定的高通量基因型鉴定方法将会极大地促进相关领域的研究。

7 结 语

随着结构基因组学向功能基因组学研究的转变,基因组学研究的中心任务也将逐渐由大规模序列测定转向大规模突变和表型研究。虽然应用转基因和基因打靶技术^[30]以传统技术所不可比拟的速度产生突变小鼠,建立了许多非凡的人类疾病动物模型,并为相关基因功能的研究提供了重要的线索^[31,32]。但这些突变小鼠和近 100 年来产生的所有的突变小鼠的总数也仅数千只,远远不能满足对约 10 万个基因

进行功能研究的需要。一些中等规模的筛选试验已经证实 ENU 诱变是一种获得与人类疾病临床症状相似的小鼠模型的有效方法^[10,22,33]。更大规模的 ENU 试验将依赖于稳定的高通量基因型鉴定方法的发展。用 ENU 进行大规模的诱变试验将迅速地产生数目巨大的突变体小鼠,对某个特定基因可以产生基因功能缺失、部分基因功能丧失、基因功能获得等不同性质的突变。对这些突变小鼠表型及其遗传基础的分析将极大地丰富人类对基因功能的理解和对生命现象本质的认识。

REFERENCES(参考文献)

[1] de Angelis M H ,Flaswinkel H ,Fuchs H *et al* . Genome-wide ,large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis . *Nature Genetics* ,2000 **25** (4) :444 ~ 447

[2] Nolan P M ,Peters J ,Strivens M *et al* . A systematic ,genome-wide , phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse . *Nature Genetics* ,2000 **25** (4) :440 ~ 443

[3] Singer B ,Dosahj M K . Site-directed mutagenesis for quantitation of base-base interactions at defined sites . *Mutation Research* ,1990 **233** : 45 ~ 51

[4] Noveroske J K ,Weber J S ,Justice M J . The mutagenetic action of N-ethyl-nitrosourea in the mouse . *Mammalian Genome* ,1999 **11** (7) : 478 ~ 483

[5] Vogel E W ,Natarajan A T . DNA damage and repair in somatic and germ cells *in vivo* . *Mutation Research* ,1995 **330** :183 ~ 208

[6] Hitotsumachi S ,Carpenter D A ,Russell W L . Dose-repetition increases the mutagenic effectiveness of N-ethyl-N-nitrosourea in mouse spermatogonia . *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* , 1985 **82** :6619 ~ 6621

[7] Shedlovsky A ,McDonald J D ,Symula D *et al* . Mouse models of human phenylketonuria . *Genetics* ,1993 **134** :1205 ~ 1210

[8] Russell L B ,Russell W L . Frequency and nature of specific-locus mutations induced in female mice by radiations and chemicals :a review . *Mutation Research* ,1992 **296** :107 ~ 127

[9] Justice M J ,Noveroske J K ,Weber J S *et al* . Mouse ENU mutagenesis . *Human Molecular Genetics* ,1999 **8** (10) :1955 ~ 1963

[10] Cox R D ,Hhugill A ,Shedlovsky A *et al* . Contrasting effects of ENU-induced embryonic lethal mutations of the quaking gene . *Genomics* , 1999 **57** :333 ~ 341

[11] Justice M J ,Carpenter D A ,Favor J *et al* . Effects of ENU dosage on mouse strains . *Mammalian Genome* ,1999 **11** (7) :484 ~ 488

[12] Russel W L ,Hunsicker P R ,Raymer G D *et al* . Dose-response curve for ethylnitrosourea-induced specific-locus mutations in mouse spermatogonia . *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* , 1982 **79** :3589 ~ 3591

[13] Davis A P ,Woychik R P ,Justice M J . Effective chemical metagenesis in FVB/N mice requires low doses of ethylnitrosourea . *Mammalian Genome* ,1998 **10** :308 ~ 310

[14] Roger D C ,Fisher E M ,Brown S D *et al* . Behavioral and functional analysis of mouse phenotype SHIRPA :a proposed protocol for comprehensive phenotypic analysis of mouse mutants . *Mammalian Genome* ,1997 **8** :711 ~ 713

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部

- [15] Schimenti J ,Bucan M. Functional genomics in the mouse :phenotype-based mutagenesis screen. *Genome Research* ,1998 **8** :698 ~ 710
- [16] Rinchik E M ,Carpenter D A. N-ethyl-N-nitrosourea mutagenesis of a 6-to 11 cm subregion of the Fah-Hbb interval of mouse chromosome 7 :completed testing of 4557 gametes and deletion mapping and complementation analysis of 31 mutations. *Genetics* ,1999 **152** :373 ~ 383
- [17] Ramirez-solis R ,Liu P ,Bradley A. Chromosome engineering in mice. *Nature* ,1995 **378** :720 ~ 724
- [18] van Deursen J V ,Fomered M ,van Rees *et al* . Cre-mediated site-specific translocation between nonhomologous mouse chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A* ,1995 **92** :7376 ~ 7380
- [19] Zheng B ,Mills A A ,Bradley A. A system for rapid generation of coat color-tagged knockouts and defined chromosomal rearrangements in mice. *Nucleic Acids Research* ,1999 **27** (11) :2354 ~ 2360
- [20] Chen Y ,Yee D ,Dains K *et al* . Genotype-based screen for ENU-induced mutations in mouse embryonic stem cells ,*Nature Genetics* , 2000 **24** :314 ~ 317
- [21] Silver L. *Mouse Genetics* ,Oxford ,Oxford University Press
- [22] Isaacs A M ,Davies K E ,Hunter A J. Identification of two new Pmp22 mouse mutants using large-scale mutagenesis and a novel rapid mapping strategy. *Human Molecular Genetics* 2000 **22** (12) :1865 ~ 1871
- [23] Livak K J ,Marmaro J ,Todd J A. towards fully automated genome-wide polymorphism screening. *Nature Genetics* ,1995 **9** :341 ~ 342
- [24] Chen X ,Livak K J ,Kwok P Y :A homogeneous ligase-mediated DNA diagnostic test. *Genome Research* ,1998 **8** :549 ~ 556
- [25] Ross P ,Hall L ,Smirnov I *et al* . High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nature Biotechnology* ,1998 **16** :1347 ~ 1351
- [26] Hoogendoorn B ,Owen M J ,Oefner P J *et al* . Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Human Genetics* ,1999 **104** :89 ~ 93
- [27] Sapolsky RJ ,Hsie L ,Berno A *et al* . High-throughput polymorphism screening and genotyping with high density oligonucleotide arrays. *Genet Anal* ,1999 **14** :187 ~ 192
- [28] Nyren P ,Pettersson B ,Uhlen M. Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical Biochemistry* ,1993 **280** :171 ~ 175
- [29] Lyamichev V ,Mast A L ,Hall J G *et al* . Polymorphism identification and quantitative detection of genomic DNA by invasive cleavage of oligonucleotide probes. *Nature Biotechnology* ,1999 **17** :292 ~ 296
- [30] YANG X (杨晓) ,HUANG P T (黄培堂) ,HUANG C F (黄翠芬) . Progress of gene targeting in mouse ,*Chinese Science Bulletin (科学通报)* ,2000 **45** (15) :1584 ~ 1592
- [31] Bedell M A ,Jenkins N A ,Copeland N G :Mouse models of human disease. Part I. Techniques and resources for genetic analysis in mice. *Genes Dev* ,1997 **11** :1 ~ 10
- [32] Bedell M A ,Jenkins N A ,Copeland N G :Mouse models of human disease. Part II . Recent progress and future directions. *Genes Dev* , 1997 **11** :11 ~ 43
- [33] King D P ,Zhao Y ,Sangoram A M *et al* . Positional cloning of the mouse circadian Clock gene. *Cell* ,1997 **89** :641 ~ 653

ENU Induced Mutagenesis-large-scale Study of Gene Mutagenesis and Function

SUN Yan-Song¹ YANG Xiao^{2*}

(¹ Center of Laboratory animals ,² Genetic Laboratory of Development and Diseases ,Institutes of Biotechnology , Academy of Military Medical Sciences ,Beijing 100071 ,China)

Abstract ENU mutagenesis is becoming one of the most powerful approaches for large-scale study of gene function. The mechanism of ENU mutagenesis ,factors that affect mutation rates ,the strategies of the ENU mutagenesis screening for the phenotypes , related researches and recent progresses were introduced.

Key words ENU , gene , mutagenesis

Received :December 8 ,2000

This work was supported by grants from Beijing Science Projects (954981000 ,954020600) ,National Natural Science Fund of China (30070837) ,Hi-Tech Research and Development Program of China (102-08-08-02) ,National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30025028) and the Innovation Initiation Fund of Academy of Military Medical Sciences.

* Corresponding author. Tel 86-10-63895937 ,Fax 86-10-63833521 ,E-mail :yangx@im.ac.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn